

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年4月26日 (26.04.2001)

PCT

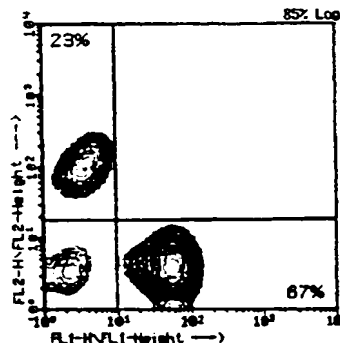
(10) 国際公開番号  
WO 01/29191 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/08, 15/12, A61K 35/14, A61P 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07385
- (22) 国際出願日: 2000年10月23日 (23.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平 11/300122  
1999年10月21日 (21.10.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): カワシマ商事株式会社 (KAWASHIMA SHOJI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒702-8043 岡山県津山市平福572-2 Okayama (JP).
- (72) 発明者: 勅使河原計介 (TESHIGAWARA, Keisuke) [JP/JP]; 〒606-0911 京都府京都市左京区松ヶ崎泉川町20-4 Kyoto (JP). 大久保祐司 (OHKUBO, Yuji) [JP/JP]; 〒604-0000 京都府京都市中京区両替町通押小路上る金吹町463 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 松尾憲一郎, 外 (MATSUO, Kenichiro et al.); 〒810-0021 福岡県福岡市中央区今泉2丁目4番26号 今泉コーポラス 1階 Fukuoka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,

/続葉有/

(54) Title: METHOD OF *IN VITRO* CULTURE OF LYMPHOCYTES AND GENE THERAPY COMPOSITIONS

(54) 発明の名称: リンパ球細胞の体外培養法および免疫治療用組成物



- a... 左上の分画は CD4 陽性 T 細胞  
b... 右下の分画は CD16 陽性 NK 細胞  
c... 左下の分画は CD16 陰性 NK 細胞と樹状細胞

a...UPPER LEFT FRACTION CONTAINING CD4-POSITIVE T CELLS  
b...LOWER RIGHT FRACTION CONTAINING CD16-POSITIVE NK CELLS  
c...LOWER LEFT FRACTION CONTAINING CD16-NEGATIVE NK CELLS AND DENDRITIC CELLS

(57) Abstract: A method of the *in vitro* culture of lymphocytes which comprises culturing lymphocytes together with cells prepared by expressing a specific gene in a specific cancer cell line or a cell line wherein the specific gene has been already expressed, thereby proliferating mainly NK cells or non-MHC-binding or MHC-binding killer T cells and further proliferating cancer antigen-specific killer T cells. By this method of the *in vitro* culture of lymphocytes, lymphocytes mainly comprising killer cells can be stably and efficiently produced. The lymphocytes thus obtained are usable in an immunotherapy efficacious for patients with cancer at the terminal stage for whom the existing therapies and remedies for cancer are not efficacious.

/続葉有/

WO 01/29191 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

リンパ球細胞の体外培養法は、リンパ球と、特定ガン細胞株に特定の遺伝子を発現させた細胞あるいはかかる特定の遺伝子がすでに発現している細胞株と共培養することにより、主にNK細胞またはMHC非拘束性もしくは拘束性キラーT細胞を増殖させ、更にガン抗原特異的キラーT細胞を増殖させることから構成されている。このリンパ球細胞の体外培養法は、主にキラー細胞からなるリンパ球細胞集団を安定してかつ効率的に製造することができる。

このようにして得られたリンパ球細胞集団は、従来のガン治療法や治療薬では効果のないガン末期患者に対しても有効な免疫療法に使用することができる。

## 明 細 書

## リンパ球細胞の体外培養法および免疫治療用組成物

## 技術分野

この発明は、新規なリンパ球増殖の体外培養方法及び増殖リンパ球を使用した新規な免疫治療用組成物に関するものである。また、この発明に係る免疫治療用組成物は、従来のガン治療が無効なガン患者に対しても有効であり、画期的なガン治療を実現することが可能である。

## 背景技術

従来、主に、NK細胞からなるリンパ球細胞集団を体外環境下において単独で長期間培養するには、1) EBウイルスによって変異させたB細胞に放射線を当てて増殖を抑えたものをNK細胞の維持に必要な細胞として使用し、NK細胞の培養維持に務めてきたがこの方法はNK細胞の精製を必要とする。この方法は公知である。また、2) NK細胞をリンパ球から精製せずにIL2で培養しLAK療法として用いられたことがあるが、この方法ではNK細胞は数倍にしか増殖できず、またその効果も限定されたものであった。

しかしながら、1)の方法には、発ガンに関わるウイルスとして知られているEBウイルスを使用しなければならず、このNK細胞からなるリンパ球細胞集団を使用して治療を行うということは、副作用などに関して大きな問題があった。また、変異させたB細胞の能力にも大きなばらつきがあり、安定的な培養を行うことが困難であり、さらにNK細胞の精製を必要とするため細胞の損失及び多大な労力を必要とする。2)の方法はNK細胞の増殖が数倍程度と弱く、ま

た、培養期間を長くするとキラー活性のないT細胞が選択的に増殖し治療効果が限られたものであった。

従って、本発明者らは、EBウイルスなどの発ガンに関わるウイルス等を一切使用せずに、さらにNK細胞の精製を必要としないガン治療に効果があるリンパ球細胞集団を安定して作成することができるリンパ球の体外培養法について鋭意検討・研究した結果、従来のNK細胞の培養法とは全く異なったアプローチでリンパ球細胞の体外培養法を見出した。つまり、そのリンパ球細胞体外培養法は、活性化されたNK細胞ならびにCD4陽性T細胞からなるリンパ球細胞集団を安全かつ安定的に増殖することができると共に、かかるリンパ球細胞集団が従来の免疫療法である養子免疫療法のソースとして使用することができることを見出した。また、ガン細胞傷害活性は既存の方法に比べより高いものであった。

その結果、本発明者らは、ガン細胞にB7遺伝子を発現させたものと、末梢血に由来するリンパ球と、免疫能賦活物質を色々な比率で共存させて培養することで、ガン細胞傷害活性が高いキラー活性を有するリンパ球細胞集団が増殖することからなるリンパ球細胞の体外培養法を先に提案している（日本国59336/1999）。しかしながら、このリンパ球細胞の体外培養法では、キラー活性を有するリンパ球細胞集団を数倍に増殖させることはできるけれども、かかるキラー活性を有するリンパ球細胞のうち、個々に応じたキラー細胞を選択的に誘導し10倍以上に増殖することができない。

#### 発明の開示

上記に鑑み、本発明者らは、個々に応じてキラー活性を有するキラー細胞を選択的に誘導し増殖することができるリンパ球細胞体外培養法を見出すべく更

に改良を加えた結果、主にNK細胞またはMHC非拘束性もしくは拘束性キラーT細胞を増殖させると共に、更にガン抗原特異的キラーT細胞を増殖させることができるリンパ球細胞の体外培養法を見出すことができた。このリンパ球細胞体外培養法は、キラー活性を有するリンパ球細胞のうち、個々に応じたキラー細胞を選択的に誘導し増殖することができることを見出した。また、このリンパ球細胞体外培養法によって培養増殖したキラー細胞が、従来のガン治療では無効であったガン患者に対しても有効な免疫療法のソースとして適用することができ、画期的なガン治療を実現することができることを見出してこの発明を完成した。

したがって、この発明は、キラー活性を有するリンパ球細胞のうち、個々に応じたキラー細胞を選択的に誘導し増殖することができるリンパ球細胞の体外培養法を提供することを目的としている。また、かかるリンパ球細胞の体外培養法によって培養増殖したキラー細胞を免疫療法のソースとして適用することができる免疫治療用組成物を提供することを別の目的としている。

かかる目的を達成するために、この発明は、リンパ球と、特定のガン細胞にB7遺伝子またはB7遺伝子ならびにガン抗原遺伝子などの特定の遺伝子を発現させた細胞またはこの遺伝子がすでに発現している細胞と共培養することにより、主にNK細胞またはMHC非拘束性もしくは拘束性キラーT細胞を増殖させ、更にガン抗原特異的キラーT細胞を増殖させることを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法を提供する。

また、この発明の好ましい態様として、上記特定ガン細胞としてクラス1抗原の発現が欠失もしくは低下しているガン細胞を使用することを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法を提供する。更に、好ましい別の態様として、この発明は、上記発現遺伝子として、B7遺伝子またはB7遺伝子ならびにガン抗原

遺伝子または細胞接着因子の遺伝子を使用することを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法を提供する。その上、好ましい別の態様として、この発明は、上記リンパ球として、末梢血から分離直後のリンパ球またはガン細胞の傷害を容易にする免疫能の賦活物質で活性化したリンパ球を使用することを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法を提供する。

上記のリンパ球細胞の体外培養方法に加えて、この発明は、上記リンパ球細胞体外培養方法によって得たNK細胞またはキラーT細胞を増殖させることによって得たリンパ球細胞からなる免疫治療用組成物を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、NK細胞とガン抗原特異的キラーT細胞との関係を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

この発明に係るリンパ球細胞の体外培養法は、リンパ球と、ガン細胞に特定の遺伝子、例えば、B7遺伝子またはB7遺伝子ならびにガン抗原遺伝子などの特定遺伝子を発現させた細胞、あるいはすでにこれらの特定の遺伝子がすでに発現している細胞とを共培養することにより、主にNK細胞またはMHC非拘束性もしくは拘束性キラーT細胞を増殖させ、更にガン抗原特異的キラーT細胞を増殖させることからなっている。

この発明において使用することができるエフェクターとしてのリンパ球としては、例えば、癌患者（悪性リンパ腫、肝臓ガン、脾臓ガン、大腸ガンなど）から、ロイコフレーション（leukopheresis）または静脈採血から得られる。通常は、人から直接採血した血液を常法に従って処理をしてリンパ球を分離し、RPMIなどにより所定の細胞濃度、例えば、 $2 \times 10^6/\text{ml}$  に調整し

て使用する。なお、この細胞濃度測定は、血球計算板を使用して行なうことができる。このように細胞濃度を所定の濃度に調整したリンパ球液をリンパ球培養原液とする。ここまでの操作は、従来からの方法に類似するものであり、この発明で使用する操作は、リンパ球培養原液を所定の濃度に希釈して最適濃度に調整してリンパ球培地を作製して使用することによって実施することができる。

他方、この発明に係るリンパ球細胞体外培養法において、特定の遺伝子を発現させるために使用するガン細胞としては、クラス1抗原の発現が欠失もしくは低下しているガン細胞株を使用することができる。かかるガン細胞株としては、例えばヒト慢性骨髄性白血病由来のK562細胞、バーキットリンパ腫由来のDaudi細胞などを挙げることができる。

なお、ガン抗原遺伝子は、ガン患者から例えば穿刺吸引法などの公知の方法によりガン細胞を採取することができRT-PCR法などの公知の方法で特定することができる。たとえば、採取したガン細胞から、酸・グアニジウムチオシアネート/フェノールクロロホルム抽出法（AGPC法）によってRNAを抽出し、RT（Reverse Transcription）反応により得られたcDNAを鋳型として放射性同位元素を用いたPCR法あるいはDNAチップ等によってその発現を検出してガン抗原遺伝子を特定することができる。

かかる特定の遺伝子を上記のガン細胞に導入する方法にしても、公知の方法を使用することができ、その方法としては、たとえば、マイクロインジェクション法、燐酸カルシウム-DNA共沈法、DEAE-デキストラン法、リボソーム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法（電気穿孔法）、アグロバクテリウム、レトロウィルス、アデノウィルス、ヘルペスウィルス、バクテリオファージなどの微生物を使用した遺伝子導入法、微量核種法、細胞融

合による導入法などが挙げられる。このような公知の方法を用いて標的ガン細胞株に遺伝子を導入発現させる方法も従来の方法を使用することができる。たとえば、発現遺伝子をネオマイシン、ハイグロマイシンなどに対する薬剤耐性遺伝子が組み込まれた発現ベクターに結合し、その発現遺伝子を電気穿孔法などの公知方法によって標的細胞に導入する。遺伝子導入後、ネオマイシン、ハイグロマイシンなどの薬剤を添加して、目的の遺伝子が導入された細胞以外の細胞を死滅させ、目的の遺伝子を発現している細胞だけを回収する。このようにして回収した遺伝子発現細胞を、限界希釈法などの公知方法を用いて培養し増殖して、リンパ球の体外培養に使用する。なお、同様な方法によって、複数の発現遺伝子を同時に発現することもできる。したがって、複数の発現遺伝子を使用する場合には、その複数の発現遺伝子を同時に発現させた細胞を使用するのが好ましい。かかる遺伝子発現細胞をフィーダー細胞として使用する。

この発明に係るリンパ球の体外培養法は、上記のようにして調整したリンパ球培養原液を所定の濃度に希釈して最適濃度に調整して作製したリンパ球培地に、上記フィーダー細胞を一定の割合で添加して培養することによって行うことができる。この培養も特別の操作を必要とするものではなく、公知の方法に従って行うことができる。たとえば、フィーダー細胞が  $2 \times 10^4$  個/ml になるようにリンパ球培養原液を希釈したリンパ球培養調整液を添加して  $CO_2$  インキュベータで1週間以上培養する。このように培養することによって、主にNK細胞またはMHC非拘束性もしくは拘束性キラーT細胞を増殖し、更にガン抗原特異的キラーT細胞を増殖することができる。このようにして、リンパ球に、上記ガン細胞株を適切な頻度加えて共培養を行って、細胞傷害活性を有するキラー細胞を数10倍ないし1000倍以上になるまで増殖させることができる。培養した後、培養液は、PBSなどで洗浄して増殖キラー細胞を精製



する。このようにして精製したキラー細胞を採血した患者に点滴バックなどを用いて投与することができる。

なお、上記リンパ球としては、末梢血から分離直後のリンパ球の他に、ガン細胞の傷害を容易にする免疫能の賦活物質で活性化したリンパ球なども使用することができる。このようなリンパ球を活性化することができる免疫能の賦活物質としては、例えば、各種サイトカイン、各種生体応答修飾物質（BRM）、各種漢方生薬、または各種食品に含まれる有用物質、または細胞内マシナリーに影響を与える微量元素の中から選ばれた1種又は2種以上の混合物などが挙げられる。この発明において使用することができる各種サイトカインとしては、例えば、IL-1~18、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、G-CSF、M-CSF、GM-CSFなどが挙げられる。また、各種生体応答修飾物質（BRM）としては、例えば、OK432（ビシバニール、中外製薬登録商標）、シゾフィラン（ソニフィラン、科研製薬登録商標）、ウリナスタチン（ミラクリッド、持田製薬登録商標）、レンチナン、丸山ワクチンなどが挙げられる。また、各種漢方生薬、各種食品に含まれる有用物質、細胞内マシナリーに影響を与える微量元素などの各種賦活物質についての例示は、特願平11-300122に記載されていて、これらの例示も本願の記載の1部を構成するものとして参照すべきであることも留意すべきである。また、上記賦活物質は、一般には成分を損わない方法により乾燥したりまたは粉末化したりなどして、水又は他の溶媒で抽出し、必要により濃縮した抽出液として、リンパ球の培養液と混合して用いることができる。

以下、この発明に係るリンパ球細胞の体外培養法を実施例によって詳細に説明するが、この発明は、下記実施例に何ら限定されるものではないことに留意すべきである。なお、以下の説明においては、発現遺伝子として、B7遺伝子

について説明するが、B 7 遺伝子に限定する意図では一切使用していないことは自明である。

(実施例)

ガン細胞にB 7 遺伝子を発現させリンパ球と共培養する手順：

ネオマイシン耐性遺伝子を有する発現ベクターにB 7 遺伝子を組み込み、電気穿孔法によってK 5 6 2 細胞に導入発現した。得られたB 7 遺伝子発現K 5 6 2 細胞とヒトリンパ球とを、I L 2 を含んだハイメディム（ニプロ社製）にヒト血清を加えて、5 % C O <sub>2</sub> 下 3 7 ° C で培養した。なお、培養液の量は培養するリンパ球の量により異なるが、この実施例においては、ヒトリンパ球は  $1 - 5 \times 10^6 / \text{ml}$  に調整し、B 7 遺伝子発現K 5 6 2 細胞は 1 / 1 0 0 ないし 1 / 5 0 0 の割合で添加した。また、B 7 発現細胞は、マイトマイシン処理または放射線を照射して増殖できないように処置した。B 7 発現細胞は限界希釈法を用いてクローニングして、フローサイトメータで高発現細胞（6 0 0  $\mu$  G / M L）を選択して用いた。

エフェクターであるリンパ球分離手順：

ヒトから採取した血液を遠心管に入れ、リン酸緩衝溶液（P B S）にて2倍に希釈し、複数の血液分離用リンフオプレッツブチューブに移し、常温で 1 5 0 0 - 2 0 0 0 r p m で 1 5 - 2 0 分間遠心分離し、リンパ球層（いわゆる b u f f y c o a t といわれている層）を遠心管に採取し、P B S あるいは R P M I 1 6 4 0 約 1 0 0 m l で洗浄し、1 5 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離して上清を除去した。この操作を2回繰り返した後、ヒト血清加ハイメディウムを加えて、リンパ球が所定の濃度、例えば、 $4 \times 10^6$  個 / m l となるように調整した。なお、濃度測定は、血球計算板を使用して行い、できるだけ正確に測定した。このようにして得られた液をリンパ球培養原液として用いて上記の方

法と実質的には同じ方法で培養した。培養に際しては、このリンパ球培養調整液をフラスコに約5 ml 1 づつ分注して、上記フィーダー細胞の濃度が例えば  $4 \times 10^4$  個/ml になるように調製した。この培養液をCO<sub>2</sub> インキュベーターに格納し、1 週間常法に従って培養した後、このリンパ球培地を生理食塩水で洗浄して、リンパ球だけを回収して精製した。

このように処理したリンパ球を、本発明者らが先に提案している特願平9-342675号ならびに同11-174053号記載の方法で検査した。この検査の結果は、表1に示す通りであって、ガン細胞に対する傷害活性能力が約9倍も増強できることが判明した。

この検査方法の概要を説明すると、末梢血由来のリンパ球を分離し、これを培養液に加えてリンパ球培地とした。この培地を1昼夜培養装置で培養したものをエフェクターとし、ユーロピウムで標識したK562細胞をターゲットとして細胞外に放出されたユーロピウムを蛍光光度法で計測した。その結果を表1に示す。

表1：本方法適用前採血時リンパ球免疫能と本方法適用後リンパ球免疫能との比較：

	比率			
	40 : 1	20 : 1	10 : 1	5 : 1
本方法適用前採血時				
リンパ球免疫能				
細胞障害活性 (%)	5.5	3.2	1.5	1.3
本方法適用後				
リンパ球免疫能				
細胞傷害活性 (%)	96.3	80.5	70.5	55.8

表 1 の結果から明らかなように、この発明の培養方法で得られたリンパ球は、図 1 に示すように、ガン細胞に対して高い傷害活性を有する主にキラー細胞からなるリンパ球細胞集団である。なお、図 1 は、F A C S スキャン測定器（ベクトン・ディッキンソン社製）で測定した結果を示している。この結果から、得られたリンパ球細胞集団が主にNK細胞ならびにガン抗原特異的キラーT細胞からなっていることが示されている。

#### 発明の効果

以上のように、この発明に係るリンパ球細胞の体外培養法は、リンパ球と、特定のガン細胞にB7遺伝子、ガン抗原遺伝子などの特定発現遺伝子を導入発現させた細胞またはその特定発現遺伝子がすでに発現している細胞とを一定の割合で混合して共培養することによって、主にNK細胞ならびに／もしくはガン抗原特異的キラーT細胞からなるリンパ球細胞集団を著しく高い割合で安定して増殖することができる。したがって、この発明によって、かかるリンパ球細胞集団を、従来のガン治療では無効であったガン患者に対しても有効な免疫治療のソースとして使用することができ、画期的なガン治療を実現することができるという極めて大きな利点がある。

また、この発明に係るリンパ球細胞の体外培養法によって得られるリンパ球細胞集団は、これまでの発ガンに関与しているウイルスによって変異させたB細胞を使用した免疫治療に代わって、発ガンに全く関与しないガン免疫治療用薬剤としてガン免疫治療に供することができるという大きな利点もある。

更に、この発明に係るリンパ球細胞の体外培養法によって、キラー活性を有するリンパ球細胞のうち、個々に応じたキラー細胞を選択的に誘導し増殖することができる。これによって、特にガン抗原特異的キラーT細胞を安定的に増

殖させることができることから、従来のガン治療では無効であったガン患者に対しても有効な免疫療法のソースとして適用することができ、画期的なガン治療を実現することができるという特に大きな利点がある。

## 請 求 の 範 囲

1. リンパ球と、特定のガン細胞に特定遺伝子を発現させた細胞あるいはかかる特定遺伝子がすでに発現している細胞と共培養することにより、主にNK細胞またはMHC非拘束性もしくは拘束性キラーT細胞を増殖させ、更にガン抗原特異的キラーT細胞を増殖させることを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法。
2. 請求項1に記載するリンパ球細胞の体外培養法において、前記ガン細胞がクラス1抗原の発現が欠失もしくは低下しているガン細胞であることを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法。
3. 請求項1または2に記載するリンパ球細胞の体外培養法において、前記特定遺伝子が、B7遺伝子またはB7遺伝子ならびにガン抗原遺伝子または細胞接着因子の遺伝子であることを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法。
4. 請求項1ないし3のいずれか1項に記載するリンパ球細胞の体外培養法において、前記リンパ球が末梢血から分離直後のリンパ球またはガン細胞の傷害を容易にする免疫能の賦活物質で活性化したリンパ球であることを特徴とするリンパ球細胞の体外培養法。
5. 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のリンパ球細胞の体外培養方法によって、リンパ球と、特定のガン細胞に特定遺伝子を発現させた細胞、あるいはすでにこの特定遺伝子がすでに発現している細胞と共に培養することにより、主にNK細胞またはMHC非拘束性もしくは拘束性キラーT細胞を増殖させ、更にガン抗原特異的キラーT細胞を増殖させることによって得たリンパ球細胞からなることを特徴とする免疫治療用組成物。
6. 請求項5に記載の免疫治療用組成物において、前記リンパ球細胞が、ク

ラス 1 抗原の発現が欠失もしくは低下しているガン細胞であることを特徴とする免疫治療用組成物。

7. 請求項 5 または 6 に記載の免疫治療用組成物において、前記特定遺伝子が、B 7 遺伝子または B 7 遺伝子ならびにガン抗原遺伝子または細胞接着因子の遺伝子であることを特徴とする免疫治療用組成物。

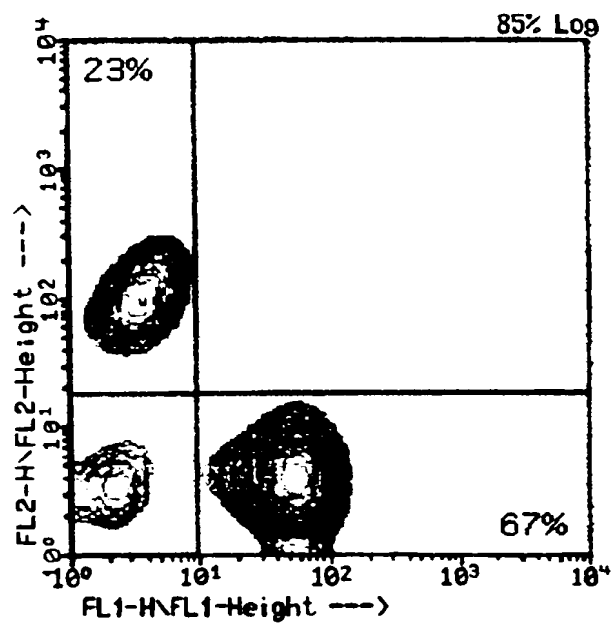
8. 請求項 5 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の免疫治療用組成物において、前記リンパ球が末梢血から分離直後のリンパ球またはガン細胞の傷害を容易にする免疫能の賦活物質で活性化したリンパ球であることを特徴とする免疫治療用組成物。





1 / 1

第 1 図



左上の分画は CD4 陽性 T 細胞

右下の分画は CD16 陽性 NK 細胞

左下の分画は CD16 陰性 NK 細胞と樹状細胞



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07385

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N5/08, 15/12, A61K35/14, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N5/08 -5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP, 2000-245451, A (Kawashima Shoji K.K.), 12 September, 2000 (12.09.00), especially, Claims; Table 2; Fig. 1 (Family: none)	1-8
A	EP, 690125, A2 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RE- SEARCH), 03 January, 1996 (03.01.96) & JP, 8-9967, A & US, 5874307, A	1-8
A	MARTIN-FONTECHA, Alfonso et al., "Triggering of Murine NK Cells by CD40 and CD86 (B7-2)", The Journal of Immunology, 15 May, 1999, Volume 162, Number 10, pages 5910-5916	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 February, 2001 (13.02.01)Date of mailing of the international search report  
20 February, 2001 (20.02.01)Name and mailing address of the ISA  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/07385

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N5/08, 15/12, A61K35/14, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N5/08 - 5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 2000-245451, A (カワシマ商事株式会社) 12.9月.2000 (12.09.00) 特に、特許請求の範囲、表2、図1を参照。 (ファミリーなし)	1-8
A	EP, 690125, A2 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RE- SEARCH) 3.1月.1996 (03.01.96) & JP, 8-9967, A & US, 5874307, A	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.02.01

国際調査報告の発送日

20.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内 田 俊 生

印

4 B

8 2 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MARTIN-FONTECHA, Alfonso et al., "Triggering of Murine NK Cells by CD40 and CD86 (B7-2)", The Journal of Immunology, May 15, 1999, Volume 162, Number 10, pages 5910-5916	1 - 8

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/07385	国際出願日 (日.月.年) 23.10.00	優先日 (日.月.年) 21.10.99	
出願人(氏名又は名称) カワシマ商事株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N5/08, 15/12, A61K35/14, A61P35/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N5/08 - 5/28		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 2000-245451, A (カワシマ商事株式会社) 12.9月.2000 (12.09.00) 特に、特許請求の範囲、表2、図1を参照。 (ファミリーなし)	1-8
A	EP, 690125, A2 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RE- SEARCH) 3.1月.1996 (03.01.96) & JP, 8-9967, A & US, 5874307, A	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
13.02.01	20.02.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 俊 生 印	4B 8214
	電話番号 03-3581-1101	内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MARTIN-FONTECHA, Alfonso et al., "Triggering of Murine NK Cells by CD40 and CD86 (B7-2)", The Journal of Immunology, May 15, 1999, Volume 162, Number 10, pages 5910-5916	1 - 8



**Translation**  
09/808720

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

**RECEIVED**

JUL 09 2002

TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference F200008-1126		<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA 416)	
International application No. PCT/JP00/07347	International filing date (day month year) 20 October 2000 (20.10.00)	Priority date (day month year) 22 October 1999 (22.10.99)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9 38.15 56.5 10. A61L 29 14 ( C12N 9 38.C12R1:91)			
Applicant SEIKAGAKU CORPORATION			

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and or drawings which have been amended and are the basis for this report and or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

**RECEIVED**

SEP 20 2002

TECH CENTER 1600/2900

Date of submission of the demand 22 February 2001 (22.02.01)	Date of completion of this report 06 November 2001 (06.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Facsimile No	Telephone No

2018 03 07

10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT JP00 07347

## I. Basis of the report

1 With regard to the **elements** of the international application:

- ☐ the international application as originally filed
- ☐ the description:
  - pages \_\_\_\_\_, as originally filed
  - pages \_\_\_\_\_, filed with the demand
  - pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:
  - pages \_\_\_\_\_, as originally filed
  - pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19
  - pages \_\_\_\_\_, filed with the demand
  - pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:
  - pages \_\_\_\_\_, as originally filed
  - pages \_\_\_\_\_, filed with the demand
  - pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:
  - pages \_\_\_\_\_, as originally filed
  - pages \_\_\_\_\_, filed with the demand
  - pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2 With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3 With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

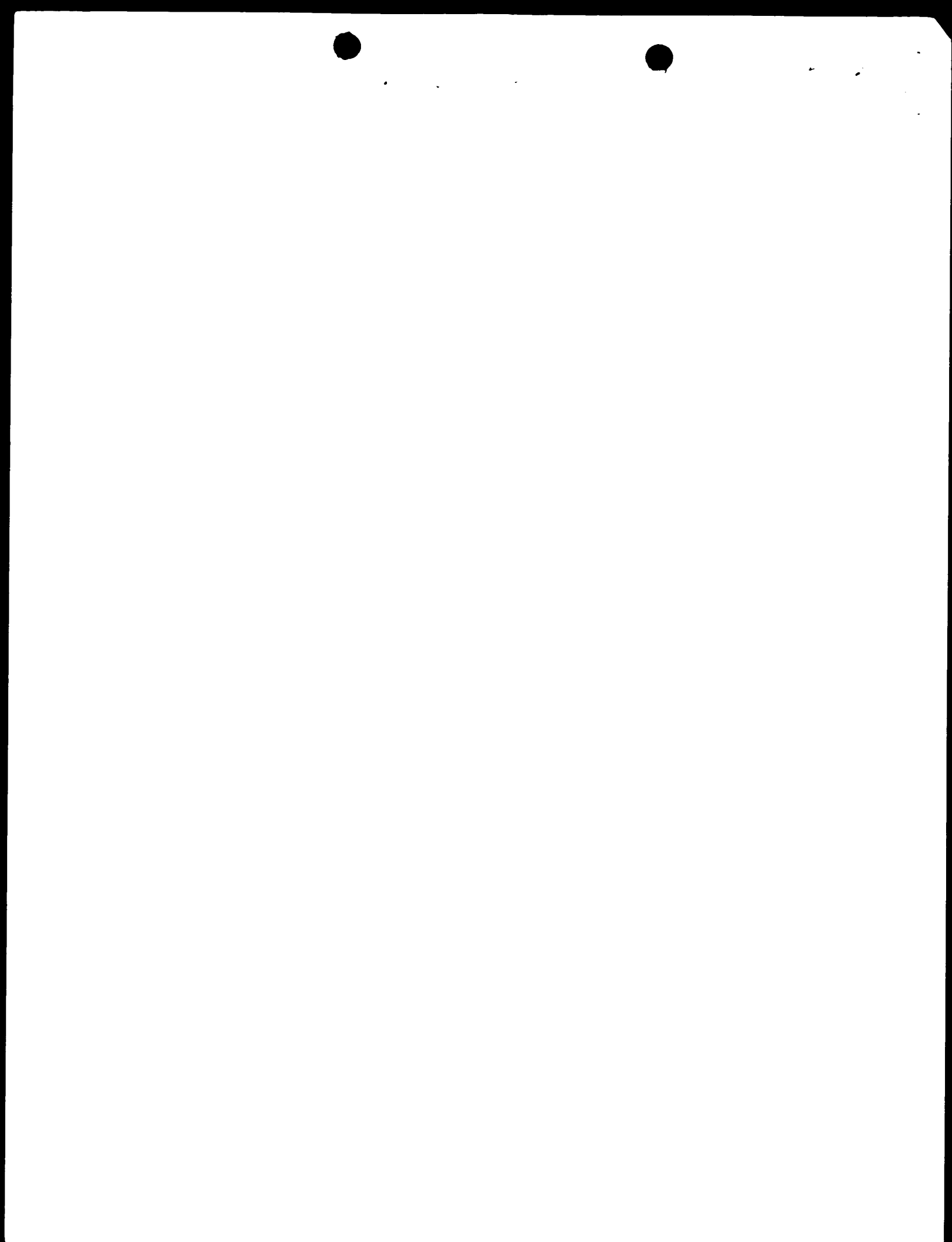
4 ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets fig. \_\_\_\_\_

5 ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be returned (under item 1) and annexed to this report.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PC/ JF 17347

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: JP, 63-52877, A. Seikagaku Corporation, 7 March 1968 (07.03.68) (Family: none)

Document 2: JP, 10-201472, A. Meiji Milk Products Co., Ltd., 4 August 1996 (04.08.96) (Family: none)

The inventions set forth in Claims 1-15 are novel and involve an inventive step relative to Document 1, cited in the international search report, and Document 2, cited for the first time here. Neither Document 1 nor Document 2 discloses a protein showing homology with the amino acid sequence of ID SE2 NC:2 in the present application, DNA coding the amino acid sequence of said protein, or the use of endo- $\beta$ -galactosidase in organ treatment; and these features could not be deduced easily by a person skilled in the art from Document 1 and 2.

